

METHOD FOR ANALYZING DISTRIBUTION OF KINDS OF m-RNA

Patent Number: JP7147982
Publication date: 1995-06-13
Inventor(s): KANBARA HIDEKI; others: 01
Applicant(s): HITACHI LTD
Requested Patent: ☐ JP7147982
Application Number: JP19930298594 19931129
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/00
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To provide the analysis method capable of simultaneously measuring especially even plural basic sequence unknown m-RNAs by a means for detecting the distribution of the various m-RNAs contained in cells.

CONSTITUTION:Many kinds of DNA oligomers are divided into every kinds, immobilized in every divisions on the surface of a solid oligomer array, and subsequently hybridized with m-RNA. A fluorescently labeled dNTP and a reverse transcriptase are used to synthesize fluorescently labeled c-DNA complementary to the m-RNA on the oligomer array. The fluorescent light of each division on the oligomer array is measured to know the distribution of the m-RNA. An oligomer having a structure comprising a poly A and an arbitrary sequence on the 3'-terminal side of the poly A is used as the oligomer.

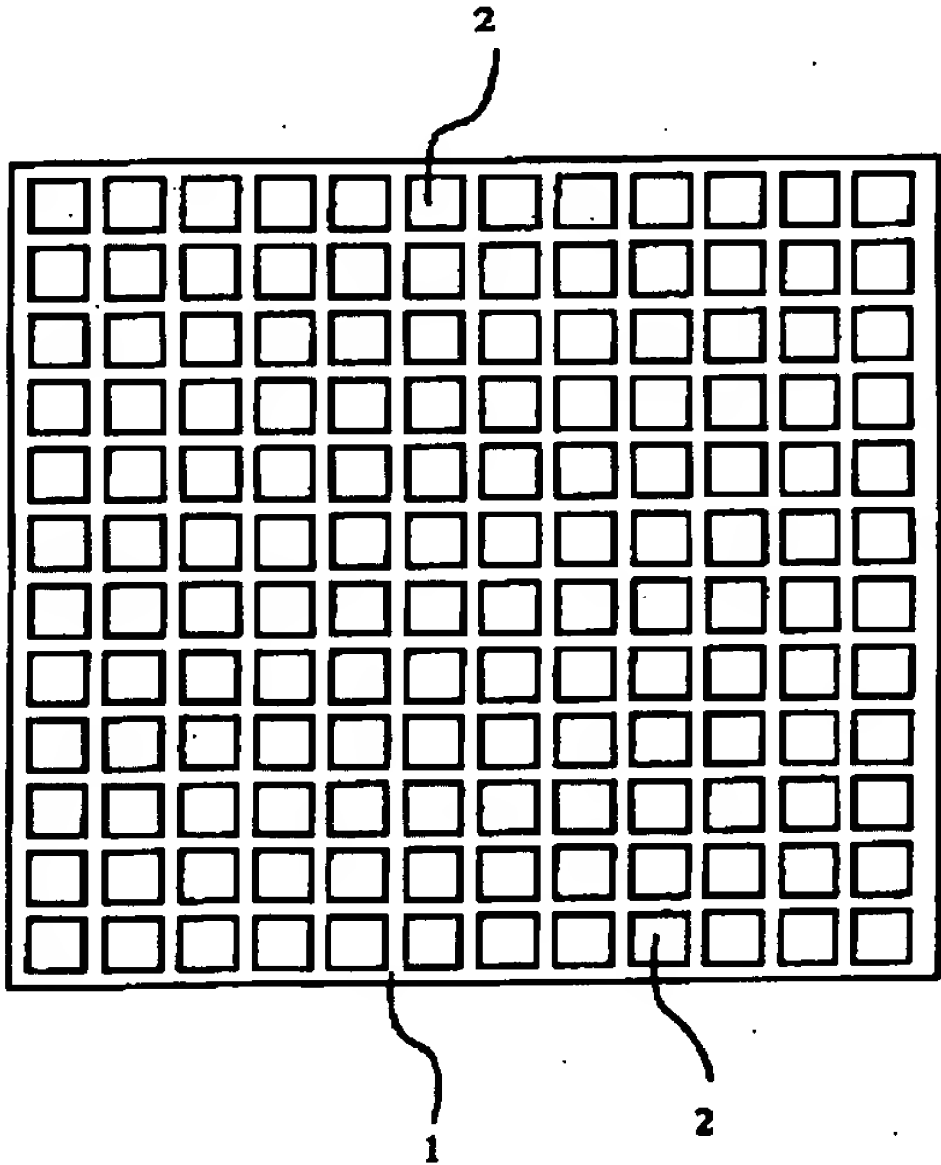
Data supplied from the esp@cenet database - I2

(51)Int.Cl. ⁶ C 1 2 N 15/00	識別記号 9281-4B	庁内整理番号 C 1 2 N 15/ 00	F I Z	技術表示箇所
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 6 頁)				

(21)出願番号 (22)出願日	特願平5-298594 平成5年(1993)11月29日	(71)出願人 (72)発明者 (72)発明者 (74)代理人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 神原 秀記 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内 岡野 和宜 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内 弁理士 平木 祐輔
---------------------	---------------------------------	--	---

(54)【発明の名称】 m-RNA種類分布解析法

(57)【要約】
【目的】 細胞中に含まれる種々のm-RNAの分布を検出する手段を提供する。特に、塩基配列が未知なm-RNAでも複数同時に分布を測定できる手段を提供する。
【構成】 多数のDNAオリゴマーを種類毎に区分けして、固体表面の各区画に固定したオリゴマーアレーをもちい、これにm-RNAをハイブリダイズさせる。蛍光標識したdNTPと逆転写酵素を用いて、オリゴマーアレー上のm-RNAに相補的で蛍光標識されたc-DNAを合成する。オリゴマーアレー上の各区画の蛍光を測定することでm-RNAの分布を知る。オリゴマーはポリAとその3'末端側の任意配列からなる構造のものを用いる。
【効果】 複数のm-RNAの分布を同時に知ることができる。ポリAと任意配列からなるオリゴマーを用いることで、配列が未知のm-RNAを種類毎に分別して分布を測定することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 多種DNAオリゴマーを種類ごとに区分けして固体表面に保持したプローブチップを用いて、m-RNAの存在比を計測することを特徴とするm-RNAの解析法。

【請求項2】 DNAオリゴマーが共通配列とその3'末端側に2mer～8merの任意配列を含むものであることを特徴とする請求項1記載のm-RNAの種類分布解析法。

【請求項3】 DNAオリゴマーの共通配列が、ポリTであることを特徴とする請求項2記載のm-RNAの種類分布解析法。

【請求項4】 DNAオリゴマーの共通配列が、c-DNAの酵素切断部に導入されたオリゴマー配列あるいはそれと相補的な配列を含むことを特徴とする請求項2記載のm-RNAの種類分布解析法。

【請求項5】 DNAオリゴマーが、m-RNAあるいはcDNAに特異的にハイブリダイズする配列からなるものであることを特徴とするm-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレー。

【請求項6】 m-RNAに特異的にハイブリダイズする配列が、共通配列とその3'末端側に2mer～8merの任意配列を含むものであることを特徴とする請求項5記載のm-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレー。

【請求項7】 m-RNAに特異的にハイブリダイズする配列が、共通配列とその3'末端側に2mer～5merの任意配列を含むものであることを特徴とする請求項5記載のm-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレー。

【請求項8】 共通配列が、ポリTであって、該ポリTが5～20merである請求項6記載のm-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレー。

【請求項9】 共通配列が、c-DNAの酵素切断部に導入されたオリゴマー配列あるいはそれと相補的な配列である請求項6記載のm-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレー。

【請求項10】 (1)請求項5～8のいずれかに記載のオリゴマーアレーにm-RNA抽出液を接触させ、オリゴマーアレー表面のDNAオリゴマーに各m-RNAをハイブリダイズさせる工程、(2)逆転写酵素と4種のうち少なくとも1種の蛍光標識dNTPと他のdNTPを用いてオリゴマーアレーにハイブリダイズしたm-RNAに相補的で蛍光標識されたc-DNAを合成する工程、および(3)オリゴマーアレー上の各区分けした部位の蛍光を測定することで各m-RNAの量を定量する工程、を含むことを特徴とするm-RNAの種類分布解析法。

【請求項11】 (1)請求項5～8のいずれかに記載のオリゴマーアレーにm-RNA抽出液を接触させ、オリゴマーアレー表面のDNAオリゴマーに各m-RNAをハイブリダイズさせる工程、(2)逆転写酵素と4種のうち少なくとも1種の蛍光標識dNTPと他のdNTPを用いてオリゴマーアレーにハイブリダイズしたm-RNAに相補的で蛍光標識されたc-DNAを合成する工程、(3)c-DNAに相補的で他の蛍光体

で標識したプローブDNAをハイブリダイゼーションさせる工程、(4)c-DNAに含まれる蛍光体と上記(3)の行程でハイブリダイズさせたプローブDNA中の他の蛍光体の間のエネルギー転スファアを用いて、一方の蛍光体を励起させることで他方の蛍光体からの蛍光を検出する工程、(5)オリゴマーアレー上の各区分けした部位の蛍光を測定することで各m-RNAの量を定量する工程、を含むことを特徴とするm-RNAの種類分布解析法。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、DNAあるいはRNA、特にm-RNA種類分布あるいは存在比の解析法に関するものである。応用として病気診断、生体機能解析などがある。

【0002】

【従来の技術】 生体内あるいは細胞内で起こっている現象は、その中で活動しているm-RNAの種類と量を知ることによってモニターできる。しかし、m-RNAは生体中に含まれるRNA分解酵素により短時間で分解されるため、細胞内においても寿命が約30分と非常に短い。このためその計測は非常に難しかったが、現在ではRNAを逆転写酵素によりc-DNAとしてこれを解析する手法が開発されている。細胞中に含まれるm-RNA、従ってc-DNAの種類は高々10万種で活動しているのは1万種前後と言われている。このc-DNAの塩基配列を決定しようとするのがc-DNAプロジェクトで日本はじめ世界各国で進められている。

【0003】 一方、細胞内m-RNAの種類分布(abundance)を知るには全てのc-DNAを作り、ベクター中にクローニングしてライブラリーを作る。この中から1つづつクローンを取っては配列を調べ、同じ配列が重複して現われる回数から存在比を求める(Nature Genet. 2, 173-179(1992))。しかし、この方法では存在比を求めるためには非常に多くの配列決定を行う必要がある。また、m-RNAからc-DNAを得るとき、固体表面に固定されたプライマーを用いてc-DNAを合成し、固体表面にc-DNAを固定したライブラリーを作る技術が開発されている(Nature 357, 519-520(1992))。このライブラリーを用いて特定の遺伝子が発現し、m-RNAが増えているか否か、あるいは特定c-DNAの塩基配列を決定することなどを行うことができる。

40 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 生体の活動状況を全体的に捕らえるには前述のように、すべてのm-RNAの種類と量、およびその時間変化や外部刺激による変化を調べることが重要であるが、これまでおこなわれているクローニング法では手間がかかりすぎ現実的でない。また、DNAプローブを用いる方法では少数のプローブを用いて、それらがハイブリダイズした量の比から種類分布を求めることはできるが既知プローブがある場合に限られプローブ数も数百以上になると現実的でない。そこで、すべてのm-RNAを検出でき、プローブが得られていない

ときでも、計測できる手法の開発が望まれている。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは、固体表面上に種々DNAオリゴマーを種別に分画して保持したチップを作成し、これを用いてm-RNAの分布解析を行うことにより上記目的が達成できることを見出し、本発明を完成した。すなわち、多種DNAオリゴマーを種類ごとに区分けして固体表面に保持したプローブチップを用いて、m-RNAの分布を計測することを特徴とするm-RNAの種類分布解析法である。

【0006】上記DNAオリゴマーとしては、共通配列とその3'末端側に2mer～8merの任意配列を含むものが挙げられ、そして、前記共通配列としては、ポリTまたはc-DNAの酵素切断部に導入されたオリゴマー配列あるいはそれと相補的な配列が挙げられる。さらに、本発明は、DNAオリゴマーがm-RNAに特異的にハイブリダイズする配列からなるものである、m-RNAの種類分布解析用のDNAオリゴマーアレーである。

【0007】上記DNAオリゴマーアレーにおけるm-RNAに特異的にハイブリダイズする配列としては、共通配列とその3'末端側に2mer～8mer、好ましくは2mer～5merの任意配列を含むものが挙げられる。そして、前記共通配列が、20mer以下のポリT、およびc-DNAの酵素切断部に導入されたオリゴマー配列あるいはそれと相補的な配列が挙げられる。

【0008】ポリT部の長さは5～20merでこれだけでは安定なハイブリドマーを作らない長さとする。これに続く任意配列の2mer～8merの部分とあわせり初めて安定になるように設計する。ポリT部の長さは、オリゴチップ上でのハイブリダイゼーションのために20mer以下であればよい。また4mer以下ではm-RNAのポリA部に対する特異性が低下する。よってポリT部の長さは5～20merがよく、さらに望ましくは6～10merがよい。また、任意配列は2～8mer程度が良く、長くなりすぎると、ここだけで安定なハイブリダイゼーションを起し、ポリA末端以外とハイブリダイズする危険性がある。

【0009】さらに、本発明は、(1)上記いずれかのオリゴマーアレーにm-RNA抽出液を接触させ、オリゴマーアレー表面のDNAオリゴマーに各m-RNAをハイブリダイズさせる工程、(2)逆転写酵素と4種のうち少なくとも1種の蛍光標識dNTPと他のdNTPを用いてオリゴマーアレーにハイブリダイズしたm-RNAに相補的で蛍光標識されたc-DNAを合成する工程、および(3)オリゴマーアレー上の各区分けした部位の蛍光を測定することで各m-RNAの量を定量する工程、を含む、m-RNAの種類分布解析法である。

【0010】さらに、本発明は、(1)上記いずれかのオリゴマーアレーにm-RNA抽出液を接触させ、オリゴマーアレー表面のDNAオリゴマーに各m-RNAをハイブリダイズさせる工程、(2)逆転写酵素と4種のうち少なくとも1

種の蛍光標識dNTPと他のdNTPを用いてオリゴマーアレーにハイブリダイズしたm-RNAに相補的で蛍光標識されたc-DNAを合成する工程、(3)c-DNAに相補的で他の蛍光体で標識したプローブDNAをハイブリダイゼーションさせる工程、(4)c-DNAに含まれる蛍光体と上記(3)の行程でハイブリダイズさせたプローブDNA中の他の蛍光体の間のエネルギー転送ファクターを用いて、一方の蛍光体を励起させることで他方の蛍光体からの蛍光を検出する工程、および(5)オリゴマーアレー上の各区分けした部位の蛍光を測定することで各m-RNAの量を定量する工程、を含むことを特徴とするm-RNAの種類分布解析法である。

【0011】本発明のDNAオリゴマーアレーは次のようにして調製する。オリゴマーの種類が多い時はScience 251, 767-773 (1991)に示されたように光化学反応で基板上に順次合成していくのが良いが、あまり多くない時は合成したDNAプローブをアレーの各区画に結合させるのが良い。後者の例を次に説明する。光反応性ビオチンを混合した重炭酸バッファ中に石英基板を入れ、ホトマスクを通して光を照射して各区画にビオチンを結合させる。次いでアビジンを結合させ、各区画にアビジンを固定する。あらかじめ合成した種々配列を持つビオチン付加DNAプローブを含む液をマイクロピペットで各区画毎に異なる配列のプローブが付着するように滴下し、ビオチン-アビジン結合を形成させて固体表面に固定してオリゴマーアレーを作製する。

【0012】オリゴチップの固体基板としては、石英板、シリコンウェハー等が用いられる。上記オリゴチップの各区画には5'末端がT(チミン)の連続するオリゴマーあるいは既知配列と持ったオリゴマーからなり、その3'末端に4種の塩基(A, C, G, T)の種々組合せからなるオリゴマー(8マー以下)部分を持つオリゴマーを一種づつ保持している。

【0013】m-RNA分布解析は次の通り行う。各種m-RNAをオリゴチップ上に供給してハイブリダイズするプロセス、次に標識物をもつヌクレオチドモノマーを用いて相補鎖合成するプロセス、及び、合成された標識物を持つポリヌクレオチドを検出するプロセスを順次行うことによりm-RNAを分布解析する。上記蛍光体は標識物として用いられるものであり、この標識物としては蛍光体の他、化学発光を誘起する物質、放射性物質などを用いることができる。

【0014】

【作用】m-RNAは3'末端にA(アデニン)がつらなった部位をもつ、このアデニン部位をハイブリダイゼーションにより選別すると共に、これに続く任意配列部を種々組合せのオリゴマー部で識別してチップ上に選別して保持する。チップ上オリゴマーの3'末端配列がm-RNAの配列と相補的に一致する時には相補鎖合成が進行し蛍光体(他の標識物でもよい)が取りこまれる。洗浄後、レー

ザー顕微鏡などを用い、蛍光体付オリゴマーの存在部位とその光量を知ることによりm-RNAの種類と分布を知ることができる。m-RNAの中には3'末端のポリA配列に隣接する配列だけは区別できないものもあるが、それらは、識別用のプローブを合成されたc-DNAにハイブリダイズさせ区別する。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】オリゴチップは、石英基板1の各区画2の表面にScience (251,767~773(1991))に報告された手法を用いてDNAオリゴマーを作成することにより調製する。このオリゴチップの模式図は図1のとおりである。このオリゴマーはリンカーを通して表面に結合させても、直接結合させてもよい。オリゴチップは縦、横100の区画からなっており、全部で10⁴箇の区画を10mm四方にもつ。ただし図1では模式図なため、区画数は実際のものより少なく表示してある。m-RNAのポリA部とハイブリダイズするポリT部の長さは5~20merでこれだけでは安定なハイブリドマーを作らない長さとする。これに続く任意配列の7マーの部分とあわせり初めて安定になるように設計する。T部の長さは、オリゴチップ上でのハイブリダイゼーションには0.15M~0.2Mの塩強度で、変性温度が40℃以下が望ましいので20mer以下であればよい。また4mer以下ではm-RNAのポリA部に対する特異性が低下する。よってポリT部の長さは5~20merがよい。さらに望ましくは6~10merがよい。任意配列は2~8mer程度が良く、長くなりすぎると、ここだけで安定なハイブリダイゼーションを起し、A末端以外とハイブリダイズする危険性がある。任意配列中ポリA, C, G, Tなどあまり意味のない配列は除去し、種々のオリゴマーを各区画に作る。

【0016】次に本方法測定の手順を図2を用いて説明する。図2は説明を容易にするために、オリゴチップの区画数やオリゴマーは実際のものより少なく書かれている。オリゴチップにはオリゴマー21~24が各区画11~14に結合している。オリゴチップを反応容器に沈めたり、周辺に枠を当てチップを底面とする反応容器を作り、m-RNA抽出液を注入して、ハイブリダイズさせる。すると図2の、31,34,のようなオリゴチップに特異的に反応するm-RNAがハイブリダイズする。次いでモノヌクレオチド(dNTP)と逆転写酵素を用いてm-RNAに対する相補DNA(c-DNA)鎖41,44を合成する。この時、dNTPのいずれか少なくとも1つ(たとえばdCTP)に蛍光標識55を入れておく。反応の結果、5'末端がオリゴチップ上に固定され、蛍光標識55を取り込んだc-DNA鎖ができる。相補鎖の伸長はm-RNA配列とオリゴマー配列が相補である場合にだけ起る。配列が一致していないがハイブリダイズが起っている場合を極力少なくするため、ポリT以外のハ

イブリダイズ領域の長さは必要最小限とし、8mer以下がよい。また、反応温度を上げて相補でない組合せのハイブリダイゼーションを除去するのもよい。鎖長は16~21merがよい。たとえばポリT部が15merで、任意配列部が6merなら変性温度が45℃前後になるので47℃~50℃の洗浄液で洗浄することで非特異的に結合したものを除くことができる。

【0017】反応液及び蛍光標識dNTPを除去し、洗浄した後、レーザー顕微鏡(あるいは蛍光検出装置)で蛍光体の付着している区画を識別し、存在するm-RNAの3'末端配列とその量を知る。生体の種々状態下で得たm-RNA分布パターンの変化から各状況下におけるm-RNAの動きを知ることができる。この方法では、1つの区画に複数のc-DNAが合成されている可能性があり、これらを識別する必要があるときは図3のように識別用の別の蛍光体で標識されたオリゴマープローブをc-DNAにハイブリダイズさせ、ハイブリダイズの有無からこれらを識別できる。すなわち、図3に示すようにオリゴチップの同じ区画にオリゴチップのオリゴマーでは分別できない61,62のような複数のm-RNAが結合しうる。この場合、逆転写酵素による相補鎖合成は、m-RNAの61,62に対しそれぞれ起り、同じ蛍光体を取り込んだ相補鎖c-DNA 71,72がそれぞれ合成される。この状態では2種のm-RNAを分別して定量することはできない。そこでまずホルムアミドや95℃の熱水により洗浄してハイブリダイズしたm-RNAを除去する。すると1本鎖状態のc-DNAだけがオリゴチップ上にのこる。この時2種のc-DNA 71,72は、お互いに異なる配列をもっているわけであるから、それぞれに特異的な第2、第3のオリゴマー81,82を用意する。オリゴマー81,82には、それぞれ異なる蛍光体91,92が結合している。91にはテトラメチルローダミン、92にはスルホローダミン101を使用すれば、He-Neレーザー(543nm)で励起できるレーザー顕微鏡を用いることでテトラメチルローダミン(TRITC)とスルホローダミン(T.R)由来の蛍光を分離して検出することができる。あるいは、c-DNAにとりこまれる蛍光体をフルオレセイン(FITC)とすることで、FITC→TRITCあるいはT.Rへのエネルギートランスファーを用いてTRITCあるいはT.Rを発光せしめ2種のm-RNAを識別定量することもできる。各c-DNAと第2、第3のオリゴマーは、ハイブリダイゼーションしているのだから、c-DNAの中のフルオレセインと第2、第3のオリゴマー中のテトラメチルローダミンやスルホローダミン101と分子レベルで接触している。よってArレーザー(488nm)でフルオレセインを励起するとハイブリダイズしているオリゴマー中のテトラメチルローダミン91やスルホローダミン101である92がエネルギートランスファーにより励起され蛍光を発する。この場合は、オリゴチップの各区画に結合したc-DNA(これは、一区画に1種のc-DNAが結合したもの)と同一区画に2種のm-RNAが結合したものを1本のレーザーで同時に検出できる利

点がある。本実施例ではフルオレセイン、テトラメチルローダミンとスルホローダミン101を用いた例を示したが、もちろん他の蛍光体、例えば、ローダミン系やフルオレセイン系、クマリン系、フタロシアニン系などの蛍光体の組合せがいろいろ使用できる。

【0018】ここではm-RNAのポリAに続く3'末端配列を認識したが、3'末端にポリAのない細菌等のm-RNAの場合には3'末端に酵素を用いてポリAを付加した後同様の操作をすればよい。配列既知のm-RNAだけをモニターすればよい場合には3'末端配列に代わってモニター配列に特異的にハイブリダイズするオリゴマーを固体表面に作成して用いればよい。

【0019】〔実施例2〕実施例1ではポリAに続く3'末端配列を認識したが、これに代えて制限酵素の切断部に続く配列を認識してもよい。ポリTプライマーを用いてm-RNAを鋳型としてDNAを合成しc-DNAを得る。c-DNAを合成する時ポリTプライマーに蛍光標識やビオチン標識を入れておく。次いで制限酵素Mbo Iなどを用いて切断する。制限酵素は（種々m-RNA中に）なるべく均等に切断部が現れる4塩基認識酵素が良い。切断部に既知配列を持つ16〜20merのオリゴマーをライゲーションにより結合させる。ライゲーションでオリゴマーを導入する代わりに末端修飾酵素 Terminal Transferase を用いて3'末端にポリAを導入しこれを既知配列として利用しても良い。

【0020】既知配列導入後RNA分解酵素RNase Hを用いてRNA鎖を分解し、c-DNA鎖（酵素切断された断片）を残す。磁気ビーズ等に付いたポリAからなるプローブを用意し、c-DNAのポリT端を持つものを分離する。分離には他の方法を用いても良い。これらの操作により5'末端にポリT配列を持ち、3'末端が既知の配列（ライゲーションにより導入されたもの）を持つc-DNAだけを得ることができる。これはm-RNAのポリA部とそこに最も近い制限酵素切断部まで配列と相補的なc-DNA断片で、各c-DNAに1個だけ存在するものである。これは蛍光標識等がされており検出する時に有効に働く、以下の手順は実施例1とほぼ同一である。

【0021】オリゴチップのポリT配列の代わりに共通オリゴマー配列を使用する事、固体表面に固定したプライマーからの相補鎖合成時に標識物を入れる必要がない点などが主な相違点である。蛍光標識を用いる以外の検出法には化学発光やエレクトロルミネッセンスなどがあるがいずれの場合も発光反応を触媒する物質たとえばアルカリフォスファターゼなどをアビジンと結合させたものを用意しておき、アビジンをDNA鎖のビオチンと結合させて目的DNAを標識した後、ルミノールなど発光試薬を添加して発光せしめて検出する。

【0022】

【発明の効果】本発明は、すべてのm-RNAをぬけおとすことなく計測し、その複数のm-RNAの存在比を同時に測定することができる利点がある。また、一枚のプローブチップにm-RNAをハイブリダイズさせ、蛍光標識したc-DNAを合成するだけなので、容易にm-RNA分布を測定することができる。また、蛍光標識したc-DNAはプローブチップの各区画上に保存されるので、これを鋳型として必要に応じて、その部位のc-DNAの相補鎖を合成し、塩基配列を決定することもできる利点がある。さらに、本発明は塩基配列が未知なm-RNAでもその分布を測定できる利点がある。また、m-RNAの反応は、すべて同一のプローブチップの表面で行われ、検出もプローブチップアレイ表面のきめられた位置の蛍光強度を測定するだけなので、ハンドリングが容易で自動化が可能になる利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】オリゴチップの概念図。

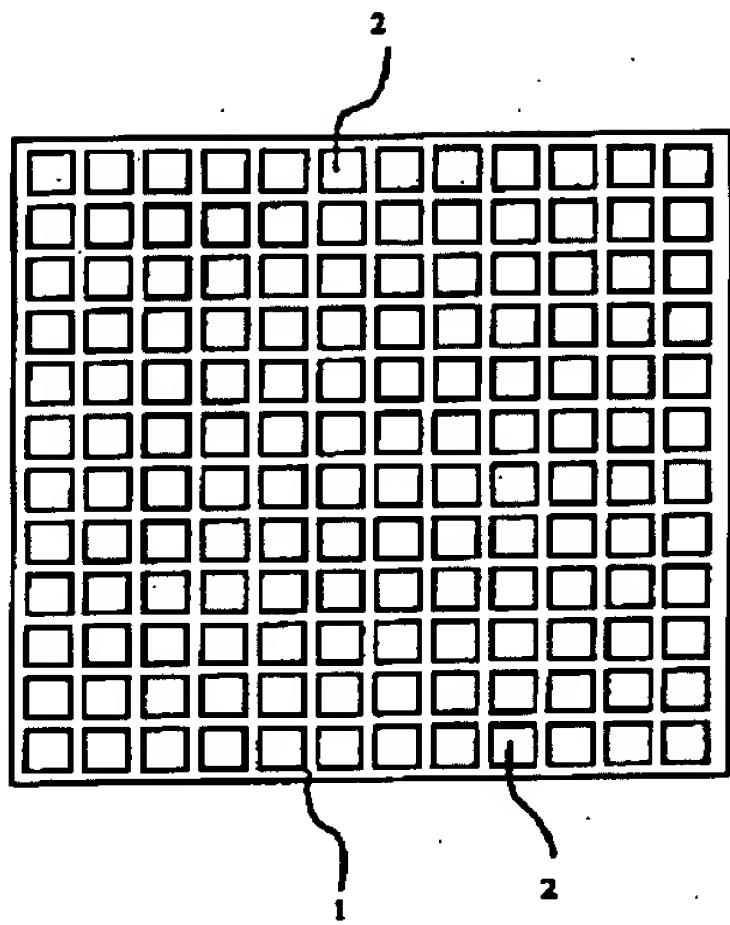
【図2】本発明でのm-RNA測定の概念図。

【図3】本発明でのオリゴチップ上の同一区画に複数のm-RNAが存在する場合のm-RNA測定の概念図。

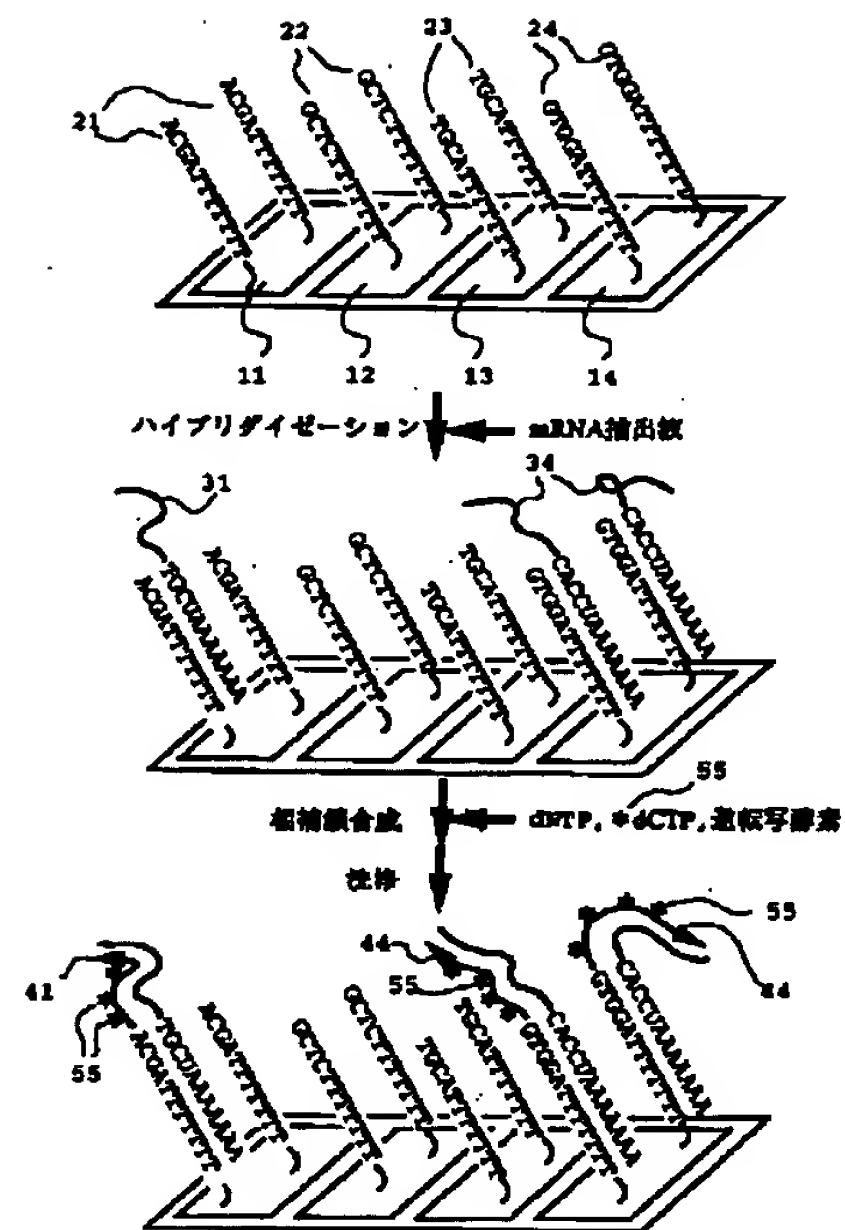
【符号の説明】

1…基板、2, 11, 12, 13, 14…区画、21, 22, 23, 24…DNAオリゴマー、31, 34, 61, 62…オリゴチップ上に捕捉されたm-RNA、41, 44, 71, 72…逆転写酵素で合成されたc-DNA、55, 91, 92…蛍光色素、81…第2のオリゴマー、82…第3のオリゴマー。

【図1】



【図2】



【図3】

